

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] 1st polypeptide cutting reagent suitable in order to be a kit and to include in :a electrophoresis gel below;

It is at least one hydrophilic film suitable for the use in transformer blotting of the polypeptide separated on electrophoresis gel. b) This film Have 2nd at least one polypeptide cutting reagent fixed on this film. A kit equipped with a hydrophobic collection member suitable [ are film; and c hydrophobic collection member, and ] in order to receive the fragmentation of the separated polypeptide which was imprinted by this hydrophobic collection member by transformer blotting on this hydrophobic collection member.

[Claim 2] The kit according to claim 1 with which said hydrophilic film and a hydrophobic collection member are offered as an assembly formed beforehand.

[Claim 3] The kit according to claim 1 or 2 with which said 2nd polypeptide cutting reagent is fixed by covalent bond on said hydrophilic film.

[Claim 4] the functional group on said hydrophilic member as which it is a kit according to claim 3, and said 2nd polypeptide cutting reagent is chosen from the group which consists of (1) activation carbonyl group, a carboxylic-acid radical, and the amino group and the carboxylic-acid derivative radical which can react here, and (2) — the kit fixed through amide association formed between the amino groups of said polypeptide cutting reagent.

[Claim 5] The kit according to claim 1, 2, 3, or 4 with which said polypeptide reagent is an enzyme, and this enzyme may be the same with kit or may differ.

[Claim 6] The kit according to claim 5 with which each enzyme contains a protease.

[Claim 7] The kit according to claim 6 with which said protease contains a trypsin.

[Claim 8] a kit according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7 — it is — further — d — the kit equipped with the buffer solution suitable in order to rehydrate the gel dehydrated partially at least by isolating at least one polypeptide.

[Claim 9] The kit according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8 said whose hydrophobic collection member is a self-supporting lamella.

[Claim 10] the approach by which the polypeptide isolated on gel by electrophoresis is identified or characterized — it is — this approach — the following process:a — process; which offers the gel from which at least one polypeptide is isolated

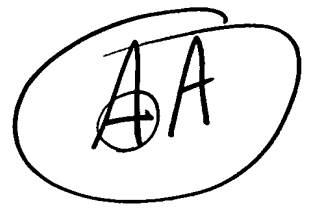
b) Process which builds the 1st polypeptide cutting reagent into this gel;

c) Process which adjoins this gel and offers at least one hydrophilic film which has 2nd at least one polypeptide cutting reagent fixed;

d) It is the process which are the process which offers a hydrophobic collection member, and is suitable for this hydrophobic collection member in order to receive the fragmentation of the polypeptide imprinted by this hydrophobic collection member from this gel by transformer blotting on this hydrophobic collection member and by which this hydrophobic layer is positioned at this hydrophilic film covering the direction of migration of the fragmentation of this polypeptide.;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-535676

(P2002-535676A)

(43) 公表日 平成14年10月22日 (2002. 10. 22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 33/68		G 0 1 N 33/68	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/37		C 1 2 Q 1/37	4 B 0 3 3
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 33/483	F 4 B 0 6 3
33/483		C 1 2 N 11/02	
// C 1 2 N 11/02		G 0 1 N 27/26	3 1 5 J
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁)	

(21) 出願番号 特願2000-596369(P2000-596369)  
(86) (22) 出願日 平成12年1月27日(2000.1.27)  
(85) 翻訳文提出日 平成13年7月12日(2001.7.12)  
(86) 国際出願番号 P C T / E P 0 0 / 0 0 6 8 9  
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 4 5 1 6 8  
(87) 国際公開日 平成12年8月3日(2000.8.3)  
(31) 優先権主張番号 9 9 0 1 7 7 5 . 8  
(32) 優先日 平成11年1月28日(1999.1.28)  
(33) 優先権主張国 イギリス (G B)  
(31) 優先権主張番号 9 9 0 7 7 9 0 . 1  
(32) 優先日 平成11年4月7日(1999.4.7)  
(33) 優先権主張国 イギリス (G B)

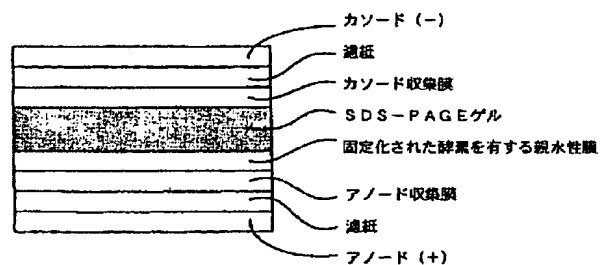
(71) 出願人 ユニヴェルシテ ドゥ ジュネーブ  
スイス国 セーアッシュー1211 ジュネーブ,  
カス ポスタル, リュ ジェネラル  
ルーデュフル 24  
(72) 発明者 ビヤンヴニユ, ウィリー ヴァンサン  
フランス国 エフ-17460 テナック,  
ルーツ デ モー 4  
(72) 発明者 ホーホシュトラッサー, ドゥニ フラン  
ソワ  
スイス国 セーアッシュー1245 ジュネーブ,  
コロンジューベルリヴ, シュマン  
ドゥ ラ サヴォニエール  
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドを同定または特徴付けるための方法およびキット

(57) 【要約】

ゲル電気泳動によって分離されたポリペプチドは、2つの主な段階を有する手順によって同定され得るかまたは特徴付けられ得る。第1段階において、このゲルは、ポリペプチド切断剤（例えば、酵素）を用いて消化される。この段階は、主に大きなフラグメントを生成し、第2段階において、親水性膜を通して電気的プロッティングされ、この膜上に、別のポリペプチド切断試薬（例えば、酵素）を疎水性部材上（代表的には、膜（例えば、P V D F））に固定化する。得られたフラグメント（通常は、ペプチド）は、好ましくは、MALDI-TOF MSによって同定されるか、または性質が、例えば、抗体との相互作用によって決定され得る。



**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** キットであって、以下：

- a) 電気泳動ゲルに組み込むために適切な第1のポリペプチド切断試薬；
- b) 電気泳動ゲル上で分離されたポリペプチドのトランスブロッティングにおける使用のために適切な、少なくとも1つの親水性膜であって、該膜は、該膜上に固定化された少なくとも1つの第2のポリペプチド切断試薬を有する、膜；および
- c) 疎水性収集部材であって、トランスブロッティングによって該疎水性収集部材に転写された分離されたポリペプチドのフラグメントを該疎水性収集部材上で受けるために適切な、疎水性収集部材を備える、キット。

**【請求項2】** 前記親水性膜および疎水性収集部材が、予め形成されたアセンブリとして提供される、請求項1に記載のキット。

**【請求項3】** 前記第2のポリペプチド切断試薬が、共有結合によって前記親水性膜上に固定化される、請求項1または2に記載のキット。

**【請求項4】** 請求項3に記載のキットであって、ここで、前記第2のポリペプチド切断試薬が、(1) 活性化カルボニル基、カルボン酸基、およびアミノ基と反応し得るカルボン酸誘導体基からなる群より選択される、前記親水性部材上の官能基と、(2) 前記ポリペプチド切断試薬のアミノ基との間に形成されるアミド結合を通して固定化される、キット。

**【請求項5】** 前記ポリペプチド試薬が酵素であり、該酵素が同じであってもよいし、または異なってもよい、請求項1、2、3または4に記載のキット。

**【請求項6】** 各酵素がプロテアーゼを含む、請求項5に記載のキット。

**【請求項7】** 前記プロテアーゼがトリプシンを含む、請求項6に記載のキット。

**【請求項8】** 請求項1、2、3、4、5、6または7に記載のキットであって、さらに、

- d) 少なくとも1つのポリペプチドが単離されており、そして脱水されているゲルを少なくとも部分的に再水和するために適切な緩衝液、

を備える、キット。

【請求項9】 前記疎水性収集部材が、自己支持膜である、請求項1、2、3、4、5、6、7または8に記載のキット。

【請求項10】 電気泳動によってゲル上で単離されているポリペプチドを同定または特徴付ける方法であって、該方法は、以下の工程：

- a) 少なくとも1つのポリペプチドが単離されているゲルを提供する工程；
  - b) 該ゲルに第1のポリペプチド切断試薬を組み込む工程；
  - c) 少なくとも1つの第2のポリペプチド切断試薬を固定化される、少なくとも1つの親水性膜を、該ゲルに隣接して提供する工程；
  - d) 疎水性収集部材を提供する工程であって、該疎水性収集部材は、該疎水性収集部材上でトランスプロットングによって該ゲルから該疎水性収集部材に転写されたポリペプチドのフラグメントを受けるために適切であって、該疎水性層は、該ポリペプチドのフラグメントの移動の方向に、該親水性膜にわたって位置付けされる、工程；
  - e) 完全ゲルから該ポリペプチドをトランスプロットングする工程であって、該第2のポリペプチド切断試薬によってポリペプチドをフラグメントへと切断させるに有効な条件下で、該完全ゲル上で、該親水性膜を通して該疎水性層に該ポリペプチドが単離された、工程；および
  - f) 該疎水性収集部材上で収集された該フラグメントを同定または特徴付ける、工程、
- を包含する、方法。

【請求項11】 請求項10に記載の方法であって、さらに、以下の工程：

g) 前記フラグメントが由来する前記ポリペプチドを同定または特徴付ける工程、

を包含する、方法。

【請求項12】 請求項10または11に記載の方法であって、ここで、前記第1のポリペプチド切断試薬が、前記ゲルを脱水することによって該ゲルに組み込まれ、そして次いで、該ゲルを、該ポリペプチド切断試薬を含む緩衝液を用いて少なくとも部分的に再水和する工程、

を包含する、方法。

【請求項13】 請求項10、11または12に記載の方法であって、ここで、前記第2のポリペプチド切断試薬の固定化が、該第2のポリペプチド切断試薬の前記親水性膜への共有結合による固定化である、方法。

【請求項14】 請求項10、11、12または13に記載の方法であって、ここで、両方の前記ポリペプチド切断試薬が酵素であり、該酵素が、同じであってもよいし、または異なってもよい、方法。

【請求項15】 前記酵素のいずれかまたは両方が、前記ポリペプチドの主鎖において該ポリペプチドを切断する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記酵素のいずれかまたは両方が、前記ポリペプチドの側鎖において該ポリペプチドを切断する、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 前記両方の酵素がトリプシンであり、そして前記電気的プロットイングが8～9のpHの緩衝液において実施される、請求項14に記載の方法。

【請求項18】 請求項10、11、12、13、14、15、16または17に記載の方法であって、ここで、前記電気的プロットイングが実施される電圧が、前記切断試薬の近接において前記ポリペプチドの滞留時間を延長させるために、通常の転写よりもゆっくり提供するように調整される。方法。

【請求項19】 請求項10、11、12、13、14、15、16、17または18に記載の方法であって、ここで、前記電気的プロットイングが、（1）アノードからカソードへの不連続な電流、または（2）カソード方向に対して該アノードにおいて偏りのある交流、のいずれかを提供する条件下で実施される、方法。

【請求項20】 請求項10、11、12、13、14、15、16、17、18または19に記載の方法であって、ここで、前記フラグメントが、質量分析によって同定される、方法。

【請求項21】 請求項20に記載の方法であって、ここで、前記膜が、マトリクス補助レーザー脱離／イオン化飛行時間型分析法によって直接走査され、そして該走査により得られたデータが、コンピュータプログラムを使用してデー

データベースと比較されて、自動化ポリペプチド同定を提供する、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (発明の背景)

## (1. 発明の分野)

本発明は、代表的にポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)からゲル上で単離された1つ以上のポリペプチドの同定および特徴付け、およびこの方法における使用のためのキットに関する。本発明は、プロテオミクス(タンパク質の大規模な同定および特徴付け)において特に有用である。

## 【0002】

## (2. 関連技術の説明)

プロテオミクスにおいて、大規模並列処理のタンパク質の同定および特徴付けの技術が、必要とされる。単にPAGEによるタンパク質または他のポリペプチドの同定は、二次元ゲル(2D-PAGE)を使用してさえも、困難でありかつしばしば不確実である。多くの異なる方法が、複雑な生物学的サンプルからタンパク質を同定し、部分的に特徴付けるために、開発されている。これらのいくつかは、マトリクス補助レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)技術を使用して、酵素を用いてタンパク質を断片化することによって生じるペプチド「フィンガープリント」を分析する。いくつかのソフトウェアプログラムは、MALDI-TOF MS実験から得られたペプチドの質量スペクトルを、タンパク質からの理論スペクトルと比較するために開発されている。この主題は、M. KussmannおよびP. Roepstorff、Spectroscopy 1998、14、1~27によって総説されている。これらの著者らは、ゲル電気泳動によって分離されたタンパク質が酵素を用いて消化されて、フラグメントペプチドを生じ得る3つの方法に注目した：

1. 消化は、切り取られたゲルの断片(plug)において実施され得、そしてペプチドは、溶出によって回収され得る。これは、この著者ら自身の選択である。
2. タンパク質は、まず、切り取られたゲル断片から電氣的溶出(electroelute)され得、次いで、溶液中で消化され得る。



3. タンパク質は、膜上に電気的プロットされ、引き続いてこの膜上で消化される。

#### 【0003】

これらの型のプロセスは、同じゲル上で泳動されたポリペプチドの配列決定について実施できない。なぜなら、ゲルからのポリペプチドバンドの切り取りは、連続的に行わなければならない、従って、断片は、さらなる分析のためにチューブに置かれて得られなければならないからである。また、ポリペプチドがチューブの壁に接着される場合に、損失が生じる。

#### 【0004】

本発明者らのうちの2人は、彼らが1工程消化転写 (one-step digestion transfer) (OSDT) と呼ぶ、異なる方法を用いて実験した。「Methods of identifying polypeptides」と題される、米国特許出願番号09/107 991 (1998年6月30日出願) および対応するカナダ国特許出願番号2 244 947 (1998年9月24日出願) を参照のこと。これらの開示は、本明細書中で参考として援用される。彼らは、ゲル上で分離されたタンパク質または他のポリペプチドが、例えば、酵素を用いる消化によってフラグメントへと切断され得ること、およびこれらのフラグメントが、切断試薬が親水性膜上に固定化され、そして従来のポリビニリデンフルオリド (PVDF) 膜として例示される、サンドイッチの1つの「スライス」としての分離ゲルと疎水性収集部材との間のプロットイング「サンドイッチ」における「充填物」として、サンドイッチの他の「スライス」として、挿入される場合に、分析 (特に、MALDI-TOF MSによる) のために非常に十分であることを示すことを見出した。この方法において、フラグメントは、疎水性部材上に収集され、次いで、MALDI-TOF MSに適切な方法において処方される。トランスプロットイングが実施されることが単に必要であり、その結果、タンパク質は、固定化された切断試薬の近傍に十分に長い滞留期間を有して、合理的な量のフラグメントが生成されること (しかし、当然のことながら、望ましくない拡散を生じない限り) を確実にする。電気的プロットイング (electroblotting) (すなわち、電場によって補助

されるプロットイング)を用いて、これは、電気的プロットイングにおいて使用される電流を適切に変化させることによって(例えば、電流をパルスすることまたは非対称の交流を使用することによって)容易に達成可能である。さらに、酵素が切断剤として使用される場合、および酵素が親水性膜上にしっかりと固定化される(特に固相に対して共有結合によって)場合、自己消化(酵素自身の消化)が、阻害される。

#### 【0005】

OSDT方法は、多くのタンパク質について良好な結果を与えるが、非常に強力な塩基性タンパク質(例えば、リゾチーム)は、好ましい酵素(トリプシン)の使用に最適である条件下で容易に転写されない。トリプシンは、pH約8.4の緩衝液において最善の消化を与える。また、OSDT方法は、非常に高い分子量のタンパク質の良好な消化を与えない。

#### 【0006】

##### (発明の要旨)

本発明は、OSDT方法に対する改善であり、そして本発明者らが「完全ゲル消化(in full gel digestion)」(IFG)と呼ぶ別の技術の開発に一部基づく。この手順は、ゲルを脱水し、次いで、このゲルを再水和すること、ポリペプチド切断試薬(例えば、酵素)を、例えば、再水和緩衝液中でゲルに添加することを包含する。IFGの後、次いで、消化されたタンパク質は、従来の方法において電気的プロットされる。この技術の1つの弱点は、ゲル中の消化の間の拡散によって、低分子量タンパク質(分子量40kDa未満のタンパク質)が損失することである。

#### 【0007】

ここで、IFG手順(必要に応じて改変される)をOSDTと合わせることによって、改善された同定によって達成されたタンパク質(または他のポリペプチド)の十分な消化が、広範な分子量を有するポリペプチドについて達成され得ることが、見出される。さらに、高分子量タンパク質は、エピトープとして同定され得るフラグメントを生じるために、十分にイムノプロットされ得る。

#### 【0008】

好ましい「組み合わせ手順」において、ゲルは、再水和され、そしてポリペプチド切断試薬を含む緩衝液を用いて、少なくとも部分的に、好ましくはほんの部分的に再水和され、I F Gが実施され、これに次いで、O S D Tが実施される。

【0009】

1つの局面において、本発明は、電気泳動によってゲル上で単離されたポリペプチドを同定または特徴付ける方法を提供し、この方法は、以下：

- a) 少なくとも1つのポリペプチドが単離されたゲルを提供する工程；
  - b) このゲル中に第1のポリペプチド切断試薬を（好ましくは、このゲルを脱水し、そしてこのゲルをこのポリペプチド切断試薬を含む緩衝液を用いて少なくとも部分的に再水和することによって）組み込む工程；
  - c) 少なくとも1つの親水性膜をこのゲルに隣接して提供する工程であって、この膜上に、少なくとも1つの第2のポリペプチド切断試薬を固定化する、工程；
  - d) 疎水性収集部材（好ましくは、膜）を提供する工程であって、この疎水性収集部材は、この疎水性収集部材上でトランスプロットング（好ましくは、電気的プロットング）によってこのゲルから疎水性収集部材に転写されるポリペプチドのフラグメントを受けるために適切であって、この疎水性部材は、このポリペプチドのフラグメントの移動の方向に、この親水性膜にわたって位置付けされる、工程；
  - e) 完全ゲルからこのポリペプチドをトランスプロットする工程であって、第2のポリペプチド切断試薬によってこのポリペプチドをフラグメントへと切断させるに有効な条件下で、この完全ゲル上で、この親水性膜を通してこの疎水性層にこのポリペプチドが単離された、工程；および
  - f) この親水性収集層上で収集されたこのフラグメントを同定または特徴付ける、工程、
- を包含する。

【0010】

好ましくは、この方法は、以下：

- g) 上記フラグメントが誘導される上記ポリペプチドを同定または特徴付ける工程、をさらに包含する。

## 【0011】

本発明はまた、本発明の方法における使用のためのキットを含み、このキットは、以下：

- a) 電気泳動ゲルに組み込むために適切な第1のポリペプチド切断試薬；
- b) 電気泳動ゲル上で分離されたポリペプチドのトランスプロットにおける使用のために適切な、少なくとも1つの親水性膜であって、この膜は、この膜上に固定化された少なくとも1つの第2のポリペプチド切断試薬を有する、膜；および
- c) 疎水性収集部材であって、トランスプロットングによってこの疎水性収集部材に転写された分離されたポリペプチドのフラグメントをこの疎水性収集部材上で受けるために適切な、疎水性収集部材を備える。

## 【0012】

要素b) およびc) は、別々の成分（例えば、別々の容器）として、または予め形成されたアセンブリとして提供され得る。

## 【0013】

用語「ポリペプチドを切断する」は、本明細書中で使用される場合、基、残基または基もしくは残基の任意の鎖が、分子の残りから分離される任意の工程をいう。この用語は、アミノ酸の主鎖または側鎖における切断あるいは任意の末端または側鎖基もしくは残基の切断を含む。例えば、カルボキシペプチダーゼによるC末端アミノ酸の除去、アミノペプチダーゼによるN末端アミノ基の除去、グリコシダーゼによるグリコシル側鎖の除去が含まれる。

## 【0014】

本発明の方法は、完全ゲルにおける消化を必要とする。すなわち、この方法は、このゲルから断片を切断する工程、およびこの切断された断片を酵素において消化する工程を含まない。

## 【0015】

脱水されているゲルに対する上記の参照は、単に、このゲルを周囲温度にて空气中に置くこと、またはこのゲルを脱水するための計画的な工程を得ることによって脱水されるようにする。用語「脱水」は、完全な、実質的に完全な、または

部分的な、ゲルからの水の除去を含む。

【0016】

本明細書中で使用される場合、用語「収集部材」は、広範な意味を有する。なぜなら、これは、それ自身、本発明に対して重要でないからである。単離において考慮すると、収集部材は、例えば、自己支持膜、フィルム、またはプレートであり得るか、あるいは、収集部材は、例えば、コーティングとしての、非自己支持（例えば、基材上に支持された疎水性層）であり得る。これは、通常、プロットティング緩衝液に対して多孔性であり、保有されるべき電流または電極からの電流を可能にするが、あるいは、これは、電極であり得るか、またはこれと直接電氣的に連絡し得る。

【0017】

用語「トランスプロットティング」は、本明細書中で使用される場合、別の表面（これは、本発明において、疎水性収集部材である）に対してポリペプチドフラグメントを転写する任意の操作を包含する。これは、毛管作用または電氣的プロットティングによる転写のプロセスを含む。この明細書において、「トランスプロットティング」は、ポリペプチドに対して適用可能な任意のプロットティング手順の部分であり得、例えば、イムノプロットティング含む。

【0018】

本明細書中で使用される場合、用語「同定（する）」は、配列を決定することと同義ではなく、そして、ポリペプチドを部分的に同定することを含む。さらに、この用語は、最も可能性のある少数の可能性に基づいて一時的に同定することを含む。

【0019】

本明細書中で使用される場合、用語「キット」は、別々の容器中の同定された成分の組み合わせ、ならびにまた、使用のために準備した親水性膜および疎水性収集層のアセンブリを含む。キットは、さらに、別々の容器、本発明の方法において有用な他の試薬（例えば、ゲルを再水和するための緩衝液、プロットティング緩衝液、酵素とポリペプチドフラグメントとの反応において補助する試薬など）を備える。

## 【0020】

(好ましい実施形態の説明)

本発明は、ゲル電気泳動によってすでにゲル上で単離されたポリペプチドを同定することに関する。同定されるべきポリペプチドの性質は、重大ではない。このポリペプチドは、例えば、天然に存在するタンパク質、組換えDNA技術によって作製されたタンパク質、ペプチド合成によって作製されたポリペプチドまたは組換えDNAの発現によって作製されたポリペプチドであり得る。簡潔のために、本発明は、本明細書中で以後、タンパク質に対する参照を用いて説明される。他のポリペプチドに対する外挿は、以下の説明全体にわたって理解されかつ援用されるように考慮される。

## 【0021】

タンパク質が単離されるゲルの種類は重要でないが、通常は、ポリアクリルアミドゲルである。従来のゲルおよび分離条件のいずれか（還元条件を含む）が、使用され得る。これらは、一次元ゲルまたは二次元ゲルであり得る（2Dゲルにおいて、タンパク質などは、それらの電荷によって一方の次元に、そしてそれらの分子量によって他方の次元に分離される）。

## 【0022】

本発明は、同じゲル上に同時に存在する複数のタンパク質（例えば、3～3000、より通常は30～3000、および好ましくは、50～1500のタンパク質）に、通常は、適用されるべきである。これは、1Dゲル上での異なる分子量の分離物または類似の分子量の分離物で存在するが、1Dゲル上の平行するレーンまたはトラック中に存在するタンパク質、ならびに2Dゲル電気泳動によって分離されたタンパク質を含む。しかし、本発明はまた、単一のポリペプチドが同定または特徴付けられることが必要とされるゲルにも適用する。特に、高分子量（例えば、150～250 kDa）のタンパク質のイムノブロットティングに対して、その高分子量のタンパク質を、エピトープがイムノブロットティングで認識され得るフラグメントに分割するために有用である。

## 【0023】

本発明の方法の第1段階は、タンパク質が分離されたゲルと同じゲル内でのタ

ンパク質の消化を包含する。この段階において、好ましくは3つの主要な操作が存在する。第1の操作は、ゲルを脱水することである。ゲルは、必要とされるタンパク質消化量に依存して、完全または部分的に脱水され得る。脱水が多いほど、その後にゲルが第1のポリペプチド切断試薬を含む溶液を吸収する能力が高くなり、従って、消化がより多くなる。脱水は完全であり得るか、実質的に完全（例えば、元の水分量の90～99重量%の除去によって）あり得るか、またはより好ましくは、部分的（例えば、同基準で、25～90重量%、好ましくは、40～70重量%の除去によって）であり得る。もちろん、完全に乾燥されたゲルを再水和することはより困難である。脱水の方法は重要ではない。周囲温度（すなわち、15～25℃）での風乾が好ましい。低圧下で4～10℃でのゲルの単なる放置は、別の方法である。風乾して、その後、放置することは、さらなる方法である。

#### 【0024】

次の操作は、再水和および第1のポリペプチド切断試薬の再水和緩衝液中の組み込みである。ポリペプチド切断試薬は、好ましくは、酵素（例えば、トリプシンまたはLys-C）であるが、化学切断試薬（例えば、CNBr）が、代替的に使用され得る。他の酵素および化学切断試薬の例は、第2のポリペプチド切断試薬の議論と関連して、後で示される。本明細書中以降、酵素とは、以下の記載において、必要な変更を加えて理解および組み込まれるように扱われる、他のポリペプチド切断試薬に対する外挿に対して言及される。第1の酵素は、トランスプロットング工程で使用される第2の酵素と同じであってもよく、異なってもよい。トランスプロットングにおける使用について以下に記載される任意の酵素が、完全ゲル消化において使用され得る。

#### 【0025】

原理的には、どの段階で第1の酵素がゲル中に導入されるか、そしてそれがゲル中で遊離形態または固定化形態のどちらで存在するかは重要でない。しかし、電気泳動の開始からゲル中に存在する場合、その酵素またはゲルを泳動する条件が、ゲルが泳動中に第1の酵素を不活性にするよう選択されない限り、その第1の酵素は、通常、タンパク質分離パターンを乱す。この不活性化は、泳動緩衝液

に、酵素の可逆的インヒビターを添加することによって達成され得る。例えば、酵素がトリプシンである場合、可逆性インヒビター（例えば、ベンズアミジン）が適切である。条件は、例えば、S. L. Jeffcoateら、J. Clin. Endocrinol. Metab. 1974 38, 155-157に記載されるようなものである。次いで、ゲルを泳動し、タンパク質の分離を生じた後、再水和工程の部分としてゲルを洗浄し、インヒビターの除去、従って酵素の再活性化を生じる。

#### 【0026】

酵素は、通常、タンパク質の単離後にゲルに添加される。これは、溶液またはゲルを浸透する微細な懸濁液として添加され、そしてゲル固体に良好に吸収される。原理的には、酵素は、任意の意図的な再水和工程の前、または再水和がもたらされた後（例えば、濃縮された溶液中）でさえ、添加され得る。しかし、原理的には、このような技術は、最良の消化を付与するようではない。通常、酵素は、緩衝化された再水和溶液中に存在する。好ましくは、ゲルは、酵素を含む再水和緩衝液と共に、例えば、35℃で30分間、インキュベートされる。時間および温度は、所望のフラグメントのサイズに従って、変更され得る。再水和は、部分的、完全、またはタンパク質がゲル上を泳動されたときよりも多くの水を、ゲルが含有する程度でさえあり得る。トランスプロッティングを可能にするために適切な、任意の程度の再水和が許容可能である。原理的には、ゲルを過剰な再水和溶液で処理すること、およびその過剰分を除去することが簡便である。さもないければ、所望でないタンパク質の拡散またはゲルの過剰な膨張が、生じ得る。

#### 【0027】

この段階で、ゲルは、部分的に消化されたタンパク質由来の、多くの誤った切断によるペプチドを含む。高分子量および塩基性のタンパク質のフラグメントが、完全な分子と比較して、電気的プロッティングによってより容易にゲルから抽出可能である。

#### 【0028】

本発明の方法の第2段階は、トランスプロッティング（好ましくは、電気的プロッティング）を含む。通常、電気的プロッティングは、タンパク質が負に荷電



するので、全体としてカソードからアノードへの方向で生じる。使用される電気的プロットング緩衝液のpHに依存して、正に荷電したフラグメントおよび負に荷電したフラグメントは、反対の方向（それぞれ、カソードおよびアノードへ）で獲得され得、そして移動し得る。図面の図1および図2は、電気的プロットングのためのいくつかのサンドイッチを例示する。図1は、カソード収集層（好ましくは、従来のPVD F膜である）が提供された実験的配置を示し、まさに、これらの条件下では、交流電界（*alternating field*）が適用された（従って、電極を反転させる）にも関わらず、タンパク質はこの膜に移動しなかったことを示す。異なるpH条件下では、いくつかのフラグメントが、カソード収集層で生成され得ることが理解される。従って、本発明は、アノード収集層およびカソード収集層に、それらの各々と分離ゲル層との間に挿入された疎水性膜を提供する可能性を含む。図1において、単一の疎水性膜（好ましくは、改変PVD F膜である）が存在し、これは、その上に固定化された適切なタンパク質切断試薬（通常、プロテアーゼ酵素（例えば、トリプシン）を有し、ゲル層とタンパク質フラグメントが収集されるアノード収集層（最も簡便には、従来のPVD F膜）との間に挿入される。図2において、カソード収集層は存在しないが、2つの連続した疎水性膜（好ましくは、改変PVD F膜）が存在し、これらは各々、その上に固定化されたトリプシンを有し、ゲル層とアノード収集層（また、好ましくは、従来のPVD F膜である）との間に配置される。

#### 【0029】

より詳細には、アノードおよびカソードは、吸収性の層によってサンドイッチの残部から分離され、この吸収性の層は、液体を電極との電気的接触中に維持しながら、プロットング液を吸い上げ、そして簡便には、濾紙である。配置に使用される電極および吸収性の層の種類は重要でなく、そして電気的プロットングに従来使用される任意のものであり得る。

#### 【0030】

アノード収集層（およびカソード収集層（使用される場合））もまた重要でなく、従って、電気的プロットングに使用される任意の従来の疎水性膜（例えば、PVD F（従来の、または正に荷電した）、ナイロンまたはニトロセルロース

のような)であり得る。

#### 【0031】

サンドイッチの「充填」は、十分に疎水性の1以上の膜(上記のように定義される)の形態をとり得、この特徴において、膜のタンパク質およびフラグメントは、膜上で固着する傾向になくなる。この膜は、任意の薄い部材から形成され得、この部材は、電気的プロットング液に対して多孔性であり、そしてその上(電気的プロットング液(従って、切断されるべきポリペプチド)にアクセス可能な隙間内のその表面上またはその中の微小腔内のいずれか)でポリペプチド切断試薬を固定化し得る。それは、代表的には、100~600 $\mu$ m厚である。通常、このような膜の数は、1~3個である。膜の従来の厚さ(例えば、好ましい「Immobilon AV」PVDF膜におけるような、130~150 $\mu$ m)を有する、2つの膜が、しばしば使用される。これらは、交互に隣接して直接的に、最良に配置される(すなわち、一方が、他方の上にある)。好ましくは、第2のポリペプチド切断試薬は、疎水性膜に共有結合される。この目的のために、疎水性膜は、好ましくは、切断試薬(例えば、酵素)に存在するアミノ基と反応性の、「活性カルボニル」またはカルボン酸基あるいはそれらの誘導体を提供される。「活性カルボニル」改変型PVDF膜またはカルボキシル改変型PVDF膜が、特に好ましい。

#### 【0032】

膜の表面上に存在する活性な基の全てを酵素と反応させることは困難であるので、そしてポリペプチドがこれらの遊離の活性な基と反応するのを許容することは望ましくないで、好ましくは、膜を使用する前に、(さもないれば、遊離であろう)残りの活性な基がキャップされる。このキャップは、例えば、エタノールアミンによって行われ、従って、比較的疎水性の $\text{—CO—NH—CH}_2\text{—CH}_2\text{—OH}$ のような末端を提供する。他の疎水性キャップ基は、当業者に示唆される。

#### 【0033】

あるいは、PVDF膜またはガラスファイバー紙は、イソチオシアネートによって官能化され得る。このイソチオシアネートは、酵素中のN末端アミノ基およ

び／またはリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基との反応を可能にする。この目的のために、PVDF膜は、NaOHで前処理され、HFの分子の除去によってポリマー鎖中に炭素-炭素エチレン二重結合を提供する。次いで、この前処理したPVDF膜を、塩基性条件下で、二核試薬(dinucleophile) (例えば、エチレンジアミン、1,10-ジアミノデカンまたは2-アミノエタンチオール) と反応させ、これによって、ポリマー中の水素原子が、 $-X-(CH_2)_n-NH_2$ 基(ここで、 $-X-$ は $-S-$ または $-NH-$ であり、そして $n$ は2または10である)で置換される。次いで、アミン末端化側鎖を有するこのポリマーを、1,4-フェニレンジイソチオシアネート(DITC)または3,5-ジクロロ-1,4-フェニレンジイソチオシアネート(DCDITC)と反応させ、必要とされるイソチオシアネート末端化側鎖を、好収率で生じる。DITC反応化ガラスファイバー紙は、別の形態の膜を提供する。例えば、R. H. Aebersoldら、J. Biol. Chem. 1986, 291, 4229-4338を参照のこと。

#### 【0034】

別の形態の疎水性膜は、アリアルアミン基で官能化されたPVDFであり、これは、酵素のカルボン酸側鎖またはカルボキシル末端と、好ましくはカルボジイミド(例えば、1-(3-ジメチルアミンプロピル)-3-エチルカルボジイミド)の存在下で反応する。

#### 【0035】

サンドイッチ充填物として使用され得る別の形態の疎水性膜は、アガロースゲルの薄層またはコーティングである。N末端アミノ基および／または酵素中のリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基(反応の選択性に従って)を処理して、アミノオキシ基を得て、このアミノオキシ基は、アガロースゲルの穏やかな酸化によって生成されるアルデヒド基と反応し、従って、酵素をアガロース(agarose)に共有結合させる。

#### 【0036】

疎水性膜のさらなる種は、ポリアクリルアミドゲルの1以上の薄層またはコーティングを含み得、これは、固定化pH勾配電気泳動(IPG)において使用さ

れる厚さと類似の厚さであるが、トリプシン化されている。これは、トリプシンとアクリロイルクロリドとを反応させて、N-アクリロイルトリプシンを形成することによってなされ得、このN-アクリロイルトリプシンは、次いで、アクリルアミドコポリマーゲルの調製において、アクリルアミドとコポリマー化される。

#### 【0037】

なお別の形態の疎水性膜は、ガラスフィルター紙であり、これは、アミノ基をジアゾ結合を含む基（例えば、4-N, N-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-イソシアネート基）によって置換するように改変されている。この目的に必要なとされる反応は、J. Y. Changら、FEBS Letters 1977, 84, 187-190によって記載されている。

#### 【0038】

膜上に固定化される切断試薬は、通常および好ましくは、共有結合によって固定化される。しかし、他の形態の固定化は、その酵素が電気的プロッティング液中の溶液中で自己消化を受けるように十分に遊離せずにある限り、本発明における使用から排除されない。（自己消化された酵素フラグメントの存在は、分析されるべきタンパク質由来のフラグメントの分析を乱し得ることが理解される）。従って、例えば、酵素は、疎水性ポリマーの多孔性シートの孔内に物理的に捕捉され得る。あるいは、膜は、親和性結合を包含する（親和性結合からなるか、または親和性結合を含む）手段によって、酵素を膜上に固定化させ得る。従って、酵素は、アビジンまたはストレプトアビジンに共有結合され得、そして生じた結合体は、アビジン/ストレプトアビジンとビオチンとの間の親和性結合によって、ビオチン化膜に結合され得る。あるいは、アビジンまたはストレプトアビジンが膜に結合され得、そして酵素は、アビジンまたはストレプトアビジンが結合された膜との反応のためにビオチニル末端化を提供するように反応され得る。

#### 【0039】

好ましくは、ポリペプチド切断試薬のいずれかまたはその両方は、酵素を含む。両方が酵素を含む場合、この酵素は同じであってもよいし、異なってもよい。最も好ましくは、そして通常は、この酵素は、ポリペプチドの主鎖を切断し

(すなわち、エンドペプチダーゼまたはエンドプロテイナーゼである)、特にトリプシンである。トリプシンは、多くのリジンおよびアルギニンのC末端側でタンパク質を切断する。他のあまり特異的でないエンドプロテアーゼ(例えば、ペプシンまたは例えばキモトリプシンのようなもの)は、例えば、Lys-C、Arg-CまたはGlu-Cのような高度に特異的な酵素と同様に使用可能である。リンタンパク質については、ホスホリラーゼが有用である。酵素のいずれかまたはその両方は、タンパク質の側鎖を切断するか、または末端に作用するエキソ酵素であり得る。1つより多くの酵素がゲル中に組み込まれ得る。1つより多くの酵素は、膜上に固定化され得る。例えば、これは、例えば、エンドプロテイナーゼとともに、カルボキシペプチダーゼまたはアミノペプチダーゼを用いて、ポリペプチドの1つ以上の側鎖を切断するために有用であり得る。カルボキシペプチダーゼYは、特に有用なこのような酵素の1つである。

#### 【0040】

タンパク質中の側鎖(例えば、グリコシル、N-アセチル-O-グルコサミニルおよびシアリル)の存在を調べるために、それらの鎖を切断する酵素(例えば、それぞれ、グリコシダーゼ、N-アセチルグルコサミニダーゼおよびノイラミニダーゼ)が本発明において有用である。

#### 【0041】

以下のチャートは、組み合わせて使用され得る酵素の型についての種々の可能性を示す：

#### 【0042】

#### 【表2】

IFG	OSDT
エンドペプチダーゼ（例えば、トリプシン）	エンドペプチダーゼ（例えば、トリプシン）
エンドペプチダーゼ（例えば、トリプシン）	エキソ酵素 （例えば、グルコシダーゼ、ホスホリラーゼ）
エキソ酵素 （例えば、グルコシダーゼ、ホスホリラーゼ）	エンドペプチダーゼ（例えば、トリプシン）
エキソ酵素 （例えば、グルコシダーゼ、ホスホリラーゼ）	エキソ酵素 （例えば、グルコシダーゼ、ホスホリラーゼ）

切断試薬は、酵素に制限されない。試薬のいずれかまたはその両方が、化学的試薬（例えば、臭化シアン、2-ヨードソ安息香酸もしくはそれらの誘導体、またはヒドロキシルアミン）であり得る。このような試薬は、E. A. Carrey、「Protein Structure: A Practical Approach」T. E. Creighton編、IRL Press, 1989の117～121頁「Peptide Mapping」に記載される。第2のポリペプチド切断剤として使用するために、この化学的試薬は、疎水性膜に適切に固定化される。従って、臭化シアンは、疎水性膜の孔内での捕捉により物理的に固定化され得る。2-ヨードソ安息香酸は、好ましくは、COOH基において、例えば、アルキレンジアミン（特に1, 6-ヘキサレンジアミン）で誘導体化され、遊離のアミノ基を残し、次いで、膜上の官能基（例えば、上記の活性なカルボキシル基）と反応する。

#### 【0043】

異なる切断試薬が異なる特性を有し、そして特定の場合においては、小フラグメントがないこと（切断がないことを示す）は、同定または特徴付けのために有用であり得ることが理解される。

#### 【0044】

電気的プロットティングに適用される電流は、好ましくは、直流の連続電流ではなく、パルスされるか（すなわち、電流が流れない間隔がある直流）または交流のいずれかである。電流は、カソードからアノードの方向へバイアスされなくてもよいし、バイアスされてもよい（すなわち、主にカソードからアノードへの電

流であるが、電流が反対の方向に流れている間隔を有する)。これらのレジメに対するバリエーションは、通常の電氣的プロットイングよりもゆっくりと行うという考え方の一般的な意図の範囲内で可能であり、このことによって、分離ゲルから収集膜へのタンパク質フラグメントのゆっくりとしたこのような移動（これは、側方への拡散を生じ、分離の喪失を引き起こす）を避けつつ、十分な時間で切断が疎水性膜上で生じることを可能にする。

#### 【0045】

電氣的プロットイング液は、タンパク質フラグメント化、従って有用な同定のいくらかの形態を得ることに対して重大ではない。この液は、通常は緩衝化され、そしてこの目的のために、従来のいずれかの緩衝液（例えば、メタノール含有 *Tris* / グリシンまたはメタノール含有 3-（シクロヘキシルアミノ）-1-プロパンスルホン酸（*CAPS*））であり得る。フラグメントの移動の方向は、本質的には、緩衝液の *pH* に依存する。大部分の目的については、アルカリ性緩衝液が適切である。なぜなら、多くの酵素は、アルカリ性 *pH* で最も良好に作用するからである。特に、トリプシンの場合においては、緩衝液は、好ましくは、8.0～9.0、そして最も特に 8.2～8.6 の *pH* を有することが好ましく、*pH* 約 8.4 の半 *Towbin's* 緩衝液（*half Towbin's buffer*）が最適であると考えられる。いくつかの他の酵素（例えば、エンドプロテイナーゼ V8）は、酸性 *pH* を要求する。このような条件下では、フラグメントは、カソードへ移動する。

#### 【0046】

少量の従来の界面活性剤（例えば、*SDS*）を緩衝液中に組み込んで、ミセル（負に荷電した凝集物）を形成させることは望ましいことが見出された。

#### 【0047】

タンパク質フラグメント（タンパク質の主鎖に由来するペプチドであるか、または側鎖の残基であるかに拘わらず）は、収集層上で収集される。次いで、それらは、好ましくはマトリクス補助レーザー脱離/イオン化（*MALDI*）またはエレクトロスプレーイオン化（*ESI*）に基づく分光学的方法により分析される。好ましい手順は、飛行時間型（*TOF*）分析を伴う *MALDI* である（*MAL*

D I - T O F M Sとしても公知)。これは、例えば、文献に記載されるように、膜上にマトリクスを形成すること（用いられる特定の波長で強く入射光を吸収する薬剤を有する）を包含する。サンプルを、MALDI質量分析機中でUVまたはIRレーザー光で気相へと励起する。イオンを蒸発により生成し、そしてイオンブームを形成する。このイオンを電場中で加速し、そして所定の距離に沿ったそれらの移動時間に従って分離し、非常に正確かつ感度の高い質量／電荷（ $m/z$ ）読みとりを与える。MALDI分光器は、PerSeptive Biosystems, Inc. (Framingham, MA, USA) から市販されており、そして文献中に記載される（例えば、M. KussmannおよびP. Roepstorf（上記で引用））。

#### 【0048】

本発明において、上記の方法は、一度に多くのタンパク質のフラグメントのスクリーニングに適用される。従って、多くのタンパク質がポリアクリルアミドゲル上で同時に泳動され得、本発明の方法に供されて、収集膜上にスポットのアレイを生成し、そしてこのアレイは、以下のように分析される。PVDF膜または他の疎水性収集層は、染色され、その一片が切断され、そしてMALDI-MSサンプルプレート（例えば、シリコングリース）上に固定される。有機性のマトリクス形成試薬が、サンプルプレート上の膜に添加され、次いで、サンプルは、風乾されて、マトリクスを形成する。このサンプルプレートは、MALDI-MS分光器中に挿入される。アレイ中の個々のスポットをレーザーと整列するための、サンプルプレートの第1の位置から第2の位置、および引き続く位置への自動化された移動は、コンピュータープログラムにより準備されている。各位置で、MALDI-MSスペクトルが生成され、このスペクトル情報をデジタル形態で収集し、そしてこのデータをExPASyデータベースリサーチプログラム（ProteinIdent）にダウンロードする。

#### 【0049】

次いで、現在MALDI-TOF MSについて使用されているように、ExPASyサーバを使用することによりこの結果の自動化された出力を提供することおよびコンピューターにより操作可能な形態にデータを生成することは比較的



単純である。

【0050】

従って、本発明は、例えば、プロテオミクス研究において、タンパク質の自動化された同定および／または部分的特徴付けについて非常に大きな潜在性を有することは明らかである。要するに、本発明は、好ましい実施形態において、この目的のための「分子スキャナ」を提供する。

【0051】

MALDI-TOF MSの質量の正確性および感度を改善するための他の技術を用いて、収集膜上で得られるタンパク質のフラグメントを分析し得る。これらとしては、遅延イオン抽出(delayed ion extraction)、エネルギー反射器およびイオン捕捉モジュール(ion-trap module)の使用が挙げられる。さらに、ポストソース崩壊(post source decay)およびMS-MS分析は、さらなる構造的分析を提供するために有用である。ESIを用いると、サンプルは液相中にあり、そして分析は、イオン捕捉、TOF、単一の四重極または多重の四重極の質量分析器による分析であり得る。このようなデバイス(単一の四重極以外)の使用は、MS-MSまたはMS<sup>n</sup>分析を行うことを可能にする。

【0052】

分析のなほ他の方法は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体およびホスホイメージング(phospho-imaging)を用いるイムノプロットティングを含む。

【0053】

必要に応じて、他の構成成分がキット中に含まれ得、特に以下のうちのいずれか1つ以上が含まれ得る：MALDI-TOFのためのマトリクス形成試薬、再水和緩衝液、電気的プロットティング緩衝液、収集層(例えば、カチオン性膜およびPAGE材料)。イムノプロットティングの場合において、このキットは、1つ以上の抗体(特にモノクローナル抗体の範囲)をさらに含み得る。上記に定義されるキット(しかしさらに、上記の必要に応じた構成成分のうちの1つ、2つ、またはそれ以上を含む)は、本発明の範囲内にいることが、本明細書により

具体的に明らかにされる。キットの全ての構成成分は、別々の容器で供給され得るが、キットとして全体がパッケージングされ得る。

#### 【0054】

以下の実施例は、本発明を例示する。用語「Immobilon」、「Trans-Blot」、「Trizma」、「Tween」および「Voyager」は、商標であり、そして／または登録商標である。

#### 【0055】

(実施例)

(材料および方法)

化学物質。「Immobilon」AV型 (IAV) 膜は、Millipore (Bedford, MA, USA) から購入した。Acrylogel-PIP 2.6% C溶液は、BDH (Poole, England) から購入した。広帯域SDS-PAGE標準PVDF膜を、Bio-Rad (Richmond, CA, USA) から購入した。トリフルオロ酢酸 (TFA)、「Trizma塩基」(Tris)、3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸 (CAPS) およびトリプシン (ブタ膵臓由来のIX型 (透析および凍結乾燥された)) をSigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。アセトニトリル (分離用HPLCグレード)、塩化カルシウム、エタノールアミン、グリシンおよび $\alpha$ -トシル-L-アルギニンメチルエステル (TAME) を、Fluka (Buch, Switzerland) から購入した。

#### 【0056】

12.5%、2.6% Cリニアゲル (自作)。PIP (PIP=N, N'-ジアシロイルピペラジン) で架橋した、12.5% T、2.6% C リニアポリアクリルアミドゲルを生成するために、8mlのAcrylogel-PIP 2.6% Cストック溶液を5mlのTris-HCl (1.5M, pH 8.8) および6.6mlの脱イオン水と混合した。ゲルの重合化を、20 $\mu$ lのTEMEDおよび100 $\mu$ lのAPS (10% w/v) で誘導した。この溶液を脱気し、そしてそしてBio-Rad mini-2Dゲル支持体に充填した。雰囲気からゲルを保護するために、0.5mlの水で飽和したsec-ブタノールを

ゲルの上部に添加した。30分後に、ゲルを、4%濃縮用ゲルの引き続く充填のために洗浄した。4%濃縮用ゲルを、2.6mlのAcrylogel-PIP 2.6% ストック溶液、5mlのTris-HCl (1.5M, pH8.8)、12.3mlの脱イオン水、20 $\mu$ lのTEMEDおよび100 $\mu$ lのAPS (10% w/v) の混合物から得た。この溶液を脱気し、そしてゲルの上部に充填した。コームを、ゲルが重合する前に挿入して、15のサンプルウェルを作製した。このゲルを重合化の30分後に直接使用し得る。

#### 【0057】

1-D PAGE。1-D PAGE法のために、Mini-Protein II電気泳動装置 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) を用いた。SDS-PAGEを、本質的には、Laemmliの方法に従い、12.5%T、2.6%C ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。使用したタンパク質サンプルは、Bio-Rad SDS-PAGE標準物質であった。それらは、ウシ膵臓トリプシンインヒビター (6.5 kDa)、ニワトリリゾチーム (14.3 kDa)、ダイズトリプシンインヒビター (20.1 kDa)、ウシカルボニックアンヒドラーゼ (28.9 kDa)、ニワトリオボアルブミン (42.7 kDa)、ウシ血清アルブミン (66.4 kDa)、およびウサギホスホリラーゼb (97.2 kDa)、E. coli  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (116.4 kDa) およびウサギミオシン (約200 kDa) であった。タンパク質の移動は、200Vで40~50分間単一のレーンで行った。

#### 【0058】

トリプシンの共有結合およびIAV膜のブロック。IAV膜は、活性化カルボキシル化基を有する市販の改変PVDF膜であった。これらの基は、求核剤 (例えば、タンパク質またはペプチドに由来するアミン基) に対して反応性である。上記に引用される「Immobilon AV」に対するMillipore技術文書に基づいて、トリプシンをこの膜に固定化した (図1)。

#### 【0059】

10 $\times$ 12cmのIAV膜を回転ハイブリダイザー HB-2D (Technique, Cambridge, England) 中で、20mlのトリプシン溶液 (

2. 5mg/ml、20mM リン酸二水素ナトリウム緩衝液 (pH7.8) 中) とともに、室温で3時間インキュベートした。次いで、この膜を、迅速かつ徹底的に、20mlのPBS-「Tween」20溶液 (20mMのリン酸二水素ナトリウム、140mM 塩化ナトリウムおよび0.5% 「Tween」20、pH7.4) で3回洗浄して、未反応のトリプシンを除去した。この膜を、20mlの1M エタノールアミン (1M 炭酸水素ナトリウム (pH9.5) 中) とともに、4℃で3時間インキュベートして、膜の残りの活性なカルボキシル基をブロックした。このキャッピング工程の後に、この膜を、迅速かつ徹底的に、20mlのPBS-「Tween」20溶液で3回洗浄し、次いで、20mlのPBS-「Tween」溶液で30分間、2回洗浄した。この膜を、46mM Tris-HCl、1.15mM 塩化カルシウム、0.1% アジ化ナトリウム緩衝溶液 (pH8.1) 中に保存した。

#### 【0060】

(IAV膜に共有結合した酵素の活性測定)

IAV-トリプシン膜のトリプシン活性を、トリプシンアッセイ試薬TAMEを用いて測定した。1~2cm<sup>2</sup>のIAV-トリプシン膜を、2.6mlの460mM Tris-HCl、11.5mM塩化カルシウム (pH8.1)、0.3mlの10mM TAME溶液、および0.1mlの1mM HCl溶液の混合物に浸した。40秒の激しい攪拌の後、この溶液の吸光度を、UV-可視分光光度計 (Ultrospec III、Pharmacia Biotech、Uppsala、Sweden) を用いて247nmで測定した。第2の測定を、3分間の一定の攪拌の後行った。1表面単位あたり等量の遊離の活性なトリプシンを、247nmの吸光度における、1分間あたりの変化から計算した。

#### 【0061】

(完全ゲル (IFG) タンパク質消化、および (比較のための) 従来の電気的プロットイング)

SDS-PAGEタンパク質分離の直後、ゲルを脱イオン水に5分間にて3回浸して、SDS、グリシン、およびTrisを除去した。湿潤ゲルの全体またはこのゲルの選択した一部を、室温で8時間または一晩の間、風乾した。このゲル

を再水和させ、ゲルの最初の体積の3～5倍の10mM Tris-HCl (pH 8.2) 中の0.05mg/mlトリプシンの溶液で30分間、35℃でインキュベートした。過剰のトリプシン溶液を取り除いた。次いで、このゲルを、35℃にてさらに30分間インキュベートして、完全に消化した。ゲル中に含まれるタンパク質およびペプチドを、タンク中でCAPS緩衝液 (pH 11)、0.01% SDSを用いて、標準的な手順を使用してPVDF膜上に電気的プロットした。

#### 【0062】

( (比較のための) 1工程消化転写 (one-digestion transfer) (OSDT) 電気的プロットイング)

SDS-PAGEタンパク質分離の直後、ゲルを脱イオン水に5分間にて3回浸して、次いで、半Towbin's緩衝液 (13mM Tris、100mM グリシン、0.01% SDS、10%メタノール (pH 8.3)) 中で15分間平衡化させた。電気的プロットイングは、研究室で作製したセミドライ装置において半Towbin's緩衝液中で行った。[注: 「セミドライ」法は、周知であり、例えば、P. R. FaussetおよびH. S. Lu、Electrophoresis 1991, 12, 22-27を参照のこと]。これを、箱型交流加電圧 (square-shape alternating applied voltage) (周期的に、+12. Vを125ms間および-5 Vを125ms間) を、用いて、室温 (21～24℃) で16時間行った。この加電圧の形を、図3に示す。ここで、電圧をY軸に対してプロットし、そしてミリ秒の時間をX軸に対してプロットする。平均有効電圧  $U_{eff} = 3.75 V$  であり、そして以下の恒等式

#### 【0063】

【数1】

$$U_{eff} = \frac{1}{T} \times [U dt \text{ の } 0 \text{ と } T \text{ との間の積分}]$$

により得られる。

ここで、 $U$ は、特定の時間点での電圧であり、 $dt$ は、積分の極限の間の時間における変化であり、そして $T$ は、1周期または期間の総時間＝250msである。

#### 【0064】

電気的ブロッティングの間にタンパク質の酵素的消化を行うために、二層のIAV-トリプシン膜を、タンパク質供給源としてのポリアクリルアミドゲルと、トランスブロッター消化サンドイッチ (transblot-digestion sandwich) を作製するための収集表面としてのPVDF膜との間に配置した (図1および2)。

#### 【0065】

電気的ブロッティング転写手順 (electroblotting transfer procedure) の後、PVDF収集膜 (すなわち、消化したタンパク質のフラグメントが収集される) を、脱イオン水で5～15分間洗浄した。電気的ブロッティング後のゲル中に残留するタンパク質を、Coomassie Blue R250 (0.1% w/v)、メタノール (30% v/v)、および酢酸 (10% v/v) で30分間染色した。ゲルをメタノール (40% v/v)、および酢酸 (10% v/v) 溶液を用いて繰り返し洗浄することにより、脱染色した。PVDF収集膜を、Amido Black (0.5% w/v)、イソプロパノール (25% v/v)、および酢酸 (10% v/v) を用いて、1分間染色し、次いで脱イオン水を用いて繰り返し洗浄することにより脱染色した。この膜を、光学スキャンの前に風乾した。

#### 【0066】

(IFG/OSDT電気的ブロッティング (本発明の組み合わせ方法))

この組み合わせ方法において、IFG手順を、最初の30分間のみを再水和および部分的タンパク質消化させることにより改変した。次いで、このゲルを上記のOSDTプロセスを用いてPVDF膜上にトランスブロットした。電気的ブロット転写を、上記のように0.01% SDSを含む半Towbin's緩衝液中で実行した。

#### 【0067】

(MALDI-TOF装置および実験条件)

PVDF膜を、337nm窒素レーザーを備えたMALDI-TOF質量分析計「Voyager」Elite (PerSeptive Biosystems, Framingham MA, USA)を用いて分析器した。分析を、18kVの加速電圧、100nsのイオン抽出 (ion extraction) の遅延、および850Daで固定した低質量ゲート (low mass gate) にて、リフレクトロン (reflectron) モードにて使用した。レーザー出力を、分子イオン生成に関する閾値をよりわずかに上に設定した。スペクトルを、任意の補整手順なしに、10~256の連続レーザー発射の累加により得た。染色したタンパク質を含むPVDFの薄片 (1×3mm<sup>2</sup>) を、PVDF収集膜から切り取り、そしてシリコンガラスを有する適合性のサンプルMALDIプレート上に固定した。MALDI-TOF MSに必要とされるマトリクスの沈着のために、30%アセトニトリル、0.1%TFA溶液中の4mg/mlの $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸の1 $\mu$ lを、アノードのPVDF膜に添加した。内部校正のために、このマトリクス溶液は、分子量1498.82Daおよび2095.08Daの2つのC-アミド化合成ペプチドを、それぞれ、20nMおよび100nM含んだ。

【0068】

(スペクトルの処理、およびソフトウェアの使用)

検出したピークを、ExPASyサーバー (<http://www.expasy.ch>) に位置付けられる、World Wide Web (<http://www.expasy.ch/www/tools.html>) において利用可能であるペプチド質量フィンガープリント検索ツール「PeptideIdent」に入力 (submit) した。検索を制限するためのpI制限を、導入しなかった。Bio-Rad技術情報シート (technical information sheet) により与えられる、見かけ上の移動質量を、質量値について20%の誤差を有する限定条件として、およびタンパク質の種の基点 (specie origin) として用いた。質量許容範囲は、 $\pm 0.2$ であった。

【0069】

フラグメント質量を、それらのスペクトル分子量から、フラグメントのアミノ酸配列を同定するために「FindMod」(<http://www.expasy.ch/www/tools.html>)に入力した。FindModは、タンパク質の可能なシステインおよびメチオニンの改変を考慮に入れるためのオプションを有する。

#### 【0070】

(結果)

トリプシンを、TAME試験により決定した場合、 $\text{cm}^2$ あたり0.6～1.2  $\mu\text{g}$ の活性トリプシンの表面酵素密度を有するIAV膜に共有結合させた。トリプシン結合IAV膜の活性は、トリプシン結合IAV膜をTris-HCl/CaCl<sub>2</sub>/NaN<sub>3</sub>溶液中で、4℃にて1ヶ月までの期間保存した場合、安定なままであった。トリプシン活性は、本発明の方法における膜の使用後にわずかに減少したが、別の実験におけるその再使用を損なうのに十分ではない。

#### 【0071】

SDS-PAGE分離後、上記に規定した9個のタンパク質を、SDS-PAGEにおける同じトラック上に泳動させ、以下のコントロール電氣的プロッティングおよび3つの異なる消化技術に供した：

—消化なしで、標準的なCAPS緩衝液(pH11)を用いる、タンク法(tank method)における、タンパク質のコントロール電氣的プロッティング、

—IFG消化、次いで、CAPS緩衝液を用いるタンク法を使用する、電氣的転写(electrotransfer)、

—セミドライ法および半Townin's緩衝液(pH8.3)を用いるIAV膜を介するOSDT消化、

—本発明の組み合わせ方法(部分的なIFGに次いでOSDT)。

#### 【0072】

図4A～4Dは、示した分子量の9個のタンパク質を有する、消化なしのコントロール(A)、IFG消化(B)、OSDT(C)および本発明の組み合わせ方法(D)に対応する、4つのAmido Black染色PVDF膜のラン



スプロットパターンを示す。図5A～5Dは、SDSゲル上に残留するタンパク質のパターンを示す。

#### 【0073】

第1に、半Towbin's緩衝液、0.01%SDS(pH8.4)を用いるOSDTを使用するタンパク質転写(図4C)を、CAPS緩衝液、0.01%SDS(pH11)を用いる標準的な転写(図4A)と比較し得る。1/2Towbin's緩衝液におけるSDSの添加にかかわらず、膵臓トリプシンインヒビター(pI 9.2)およびリゾチーム(pI 9.3)のような塩基性タンパク質は、転写されなかった。緩衝液におけるSDSの影響は、高分子量タンパク質(例えば、ホスホリラーゼb(97.2kDa)およびミオシン(約200kDa))について、より顕著であった(図4Aおよび4C)。しかし、大量のこれらのタンパク質は、電気的プロット後にゲルの中に残留した(図5Aおよび5C)。

#### 【0074】

IFG消化(図4B)および組み合わせ方法(図4D)の場合において、PVDF膜は、9つのタンパク質バンドの全てを示した。PVDFパターンは、通常の転写(図4A)に類似した。これらのPVDF膜間の主な差異は、ポリペプチドビーズの強度が、通常のタンパク質転写(図4A)についてより高く、そして組み合わせ方法(図4D)についてより低いことであった。このことにより、本発明の組み合わせ方法が、劣った結果を提供したと解釈されるべきではない。なぜならば、タンパク質の消化が、それらの染色特性を改変し得ることに注目すべきだからである。ゲルの中に残留するタンパク質は、IFG法および組み合わせ方法の両方において非常に低かった(図5Bおよび5D)。

#### 【0075】

第2の実験では、これらのサンプルを、ペプチド質量フィンガープリンティング検出のためにMALDI-MSを用いて分析した。

#### 【0076】

これらの試験の結果を、表1に要約する。OSDTプロセスに基づく最近の結果は、以前に、塩基性でかつ高分子量のタンパク質の部分的トランスプロットに

関して、上記に指摘した問題を強調した。この場合において、リゾチーム（pI 9.2）および膵臓トリプシンインヒビター（pI 9.3）ならびにミオシン（分子量約200 kDa）について、同定を獲得し得なかった。IFG消化技術は、ほとんどのタンパク質を正確に同定するのに十分なペプチドを得るのに十分ではなかった。部分的IFG、次いでOSDTの組み合わせ方法は、タンパク質同定に関して全体として最も良い結果を提供した。9個のタンパク質の全てを、分析したタンパク質のリゾチームの高pI（図6A～6CにおけるMALDI-MSスペクトルを参照のこと）およびミオシンの高分子量（図7A～7CにおけるMALDI-MSスペクトルを参照のこと）にもかかわらず同定した。図6A、7Aは、OSDTに関し、図6B、7Bは、IFG消化に関し、そして図6C、7Cは、本発明の組み合わせ方法に関する。組み合わせ手順において、生成した多数のフラグメント、および内部校正のために用いた分子量（m. w.）1498.82および2095.08のマーカータンパク質の多数のフラグメント化に注目すること。

【0077】

【表1】

表 1

タンパク質名	pI <sup>1</sup>	MW (kDa) <sup>1</sup>	OSDT		IFG		組み合わせ	
			Pept <sup>2</sup> 番号	タンパク質 Id <sup>3</sup>	Pept <sup>2</sup> 番号	タンパク質 Id <sup>3</sup>	Pept <sup>2</sup> の番号	タンパク質 Id <sup>3</sup>
ウシ脾臓 トリプシン インヒビター	9.2 4	6.5	0	-	1	-	4	+
ニワトリ リゾチーム	9.3	14.3	0	-	2	-	7	+
ダイズ トリプシン インヒビター	4.6	20.1	7	+	1	-	7	+
ウシ カルボニック アンヒドラーゼ	7.9	29.0	9	+	0	-	4	+
ニワトリ オボアルブミン	5.2	42.8	7	+	4	-	5	+
ウシ血清 アルブミン	5.6	66.4	4	+	3	-	12	+
ウサギ ホスホリラーゼ-b	6.8	97.2	12	+	1	-	17	+
E. coli β-ガラクトシダーゼ	5.3	118.1	20	+	7	+	19	+
ウサギ ミオシン <sup>4</sup>	--	223	0	-	2	-	10	+
同一性%	--	--	--	67%		11%		100%

1 pIおよび分子量は、「Compute pI/Mw」ツール (ExPASyサーバー上で入手可能) を用いて計算した。

2 ペプチドの数は、(FindModツールにより決定される) 試験下のタンパク質の正確な酵素的残基特異的フラグメントに対応するペプチドの数を同定し

た。

3 +／－：ペプチド質量フィンガープリントを用いるタンパク質の正確な同定／不正確な同定は、Peptide (ExPASyサーバー上で利用可能)により決定されるように、MALDI-MSスペクトルから得た。

4 ミオシンを、TREMBLデータベースを用いて、ウサギ骨格筋から正確に同定した。

#### 【0078】

従って、本発明の方法は、広範なpI値および分子量を有するタンパク質を同定し得ることを示した。第1に、トリプシンは、質量および／またはpIの制限なしに、ゲル中でタンパク質を消化した。この工程は、いくつかの失敗した切断に対応する高い平均分子量のペプチドを生じたが、それらのより低い分子量は、本来のタンパク質の分子量よりも低かった。いくつかのペプチドについて、pIおよび疎水性はまた、タンパク質の全体よりも低かった。第2に、これらのペプチドを、電気的ブロッティングにより容易に抽出し、そしてOSDT手順の間に再び消化した。本方法は、良好な質量スペクトルを与え、そして引き続き9個の分析したタンパク質から9個について同定した。

#### 【0079】

上記に言及したミオシンタンパク質は、たとえ0.01% SDSを有するCAPS緩衝液を用いる場合でさえ、従来の方法によりイムノプロットされ得ない。しかし、ミオシンタンパク質を、上記のトランスブロッティング手順によりイムノプロットし得る。モノクローナル抗体の使用により、ミオシンをPVDF膜上で検出し得る。

#### 【0080】

上記の刊行物の各々は、これらが本明細書に依存する程度まで、本明細書中で参考として援用される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

図1は、本発明において使用され得る2種類のブロッティング「サンドイッチ」の模式図である。

## 【図2】

図2は、本発明において使用され得る2種類のプロット「サンドイッチ」の模式図である。

## 【図3】

図3は、時間に対する印加電圧のプロットであり、本発明の方法における電気的プロットでの使用のための交流電圧の生成を示す。

## 【図4】

図4A～4Dは、収集膜上に存在する染色されたポリペプチドバンドを示し、このタンパク質およびタンパク質フラグメントは、それぞれ、コントロール（4A）、IFG消化（4B）、OSDT（4C）および本発明の組み合わせ方法（4D）について、転写された。

## 【図5】

図5A～5Dは、収集膜上に存在する染色されたポリペプチドバンドを示し、このタンパク質およびタンパク質フラグメントは、それぞれ、コントロール（5A）、IFG消化（5B）、OSDT（5C）および本発明の組み合わせ方法（5D）について、転写された。

## 【図6A】

図6A～6Cは、それぞれ、IFG（6A）、OSDT（6B）および本発明の組み合わせ方法（6C）について、ミオシンおよびニワトリリゾチームから得られたMALDI-TOF MSスペクトルを示す。

## 【図6B】

図6A～6Cは、それぞれ、IFG（6A）、OSDT（6B）および本発明の組み合わせ方法（6C）について、ミオシンおよびニワトリリゾチームから得られたMALDI-TOF MSスペクトルを示す。

## 【図6C】

図6A～6Cは、それぞれ、IFG（6A）、OSDT（6B）および本発明の組み合わせ方法（6C）について、ミオシンおよびニワトリリゾチームから得られたMALDI-TOF MSスペクトルを示す。

## 【図7A】

図7A～7Cは、それぞれ、IFG(7A)、OSDT(7B)および本発明の組み合わせ方法(7C)について、ミオシンおよびニワトリリゾチームから得られたMALDI-TOF MSスペクトルを示す。

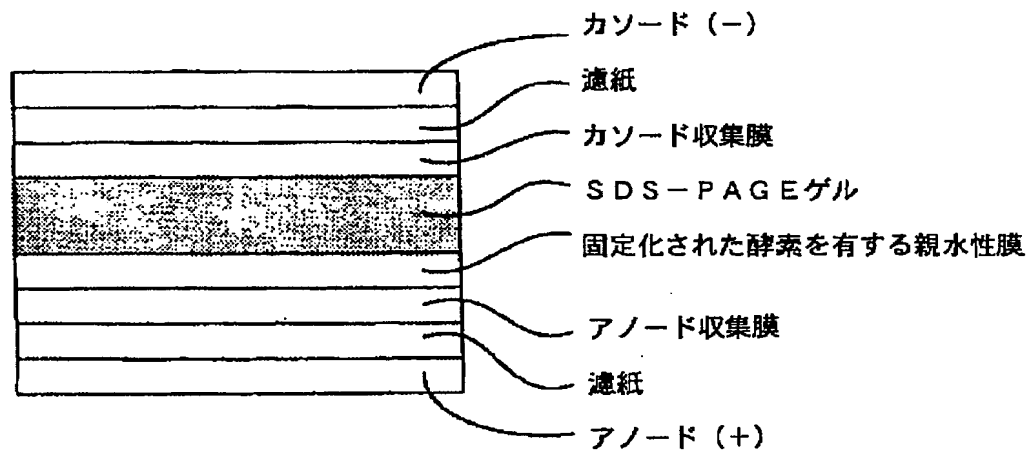
【図7B】

図7A～7Cは、それぞれ、IFG(7A)、OSDT(7B)および本発明の組み合わせ方法(7C)について、ミオシンおよびニワトリリゾチームから得られたMALDI-TOF MSスペクトルを示す。

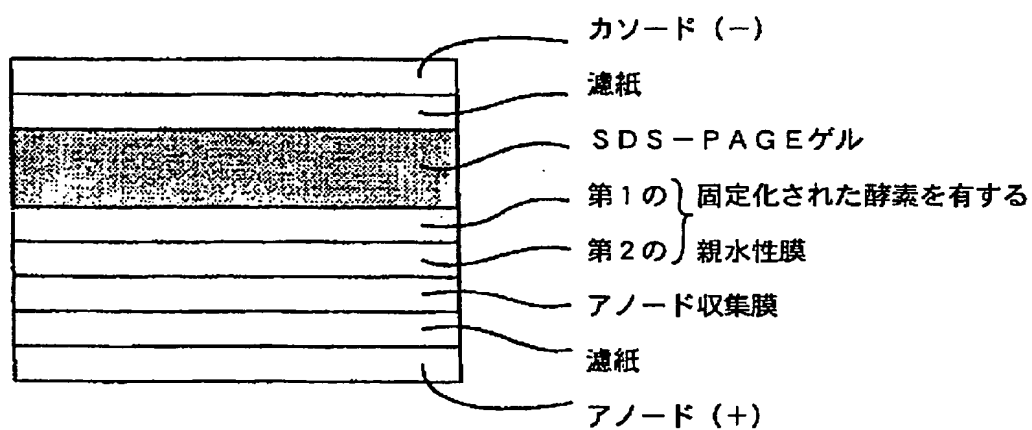
【図7C】

図7A～7Cは、それぞれ、IFG(7A)、OSDT(7B)および本発明の組み合わせ方法(7C)について、ミオシンおよびニワトリリゾチームから得られたMALDI-TOF MSスペクトルを示す。

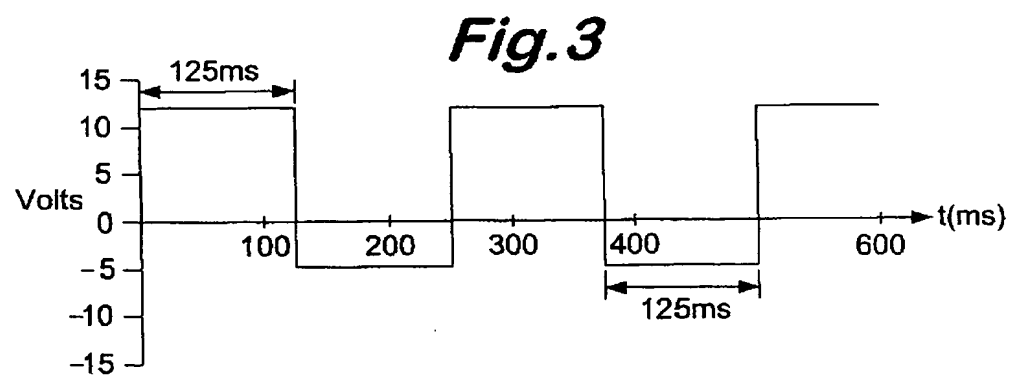
【図1】



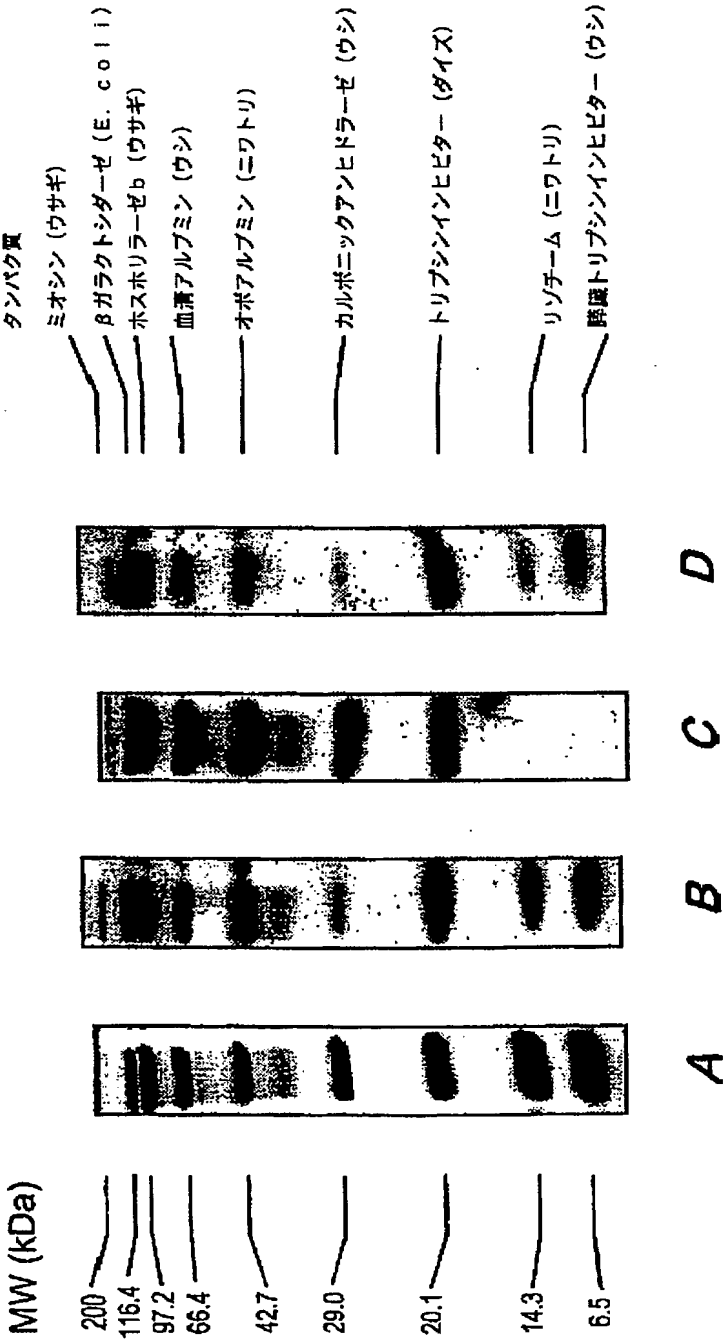
【図2】



【図3】

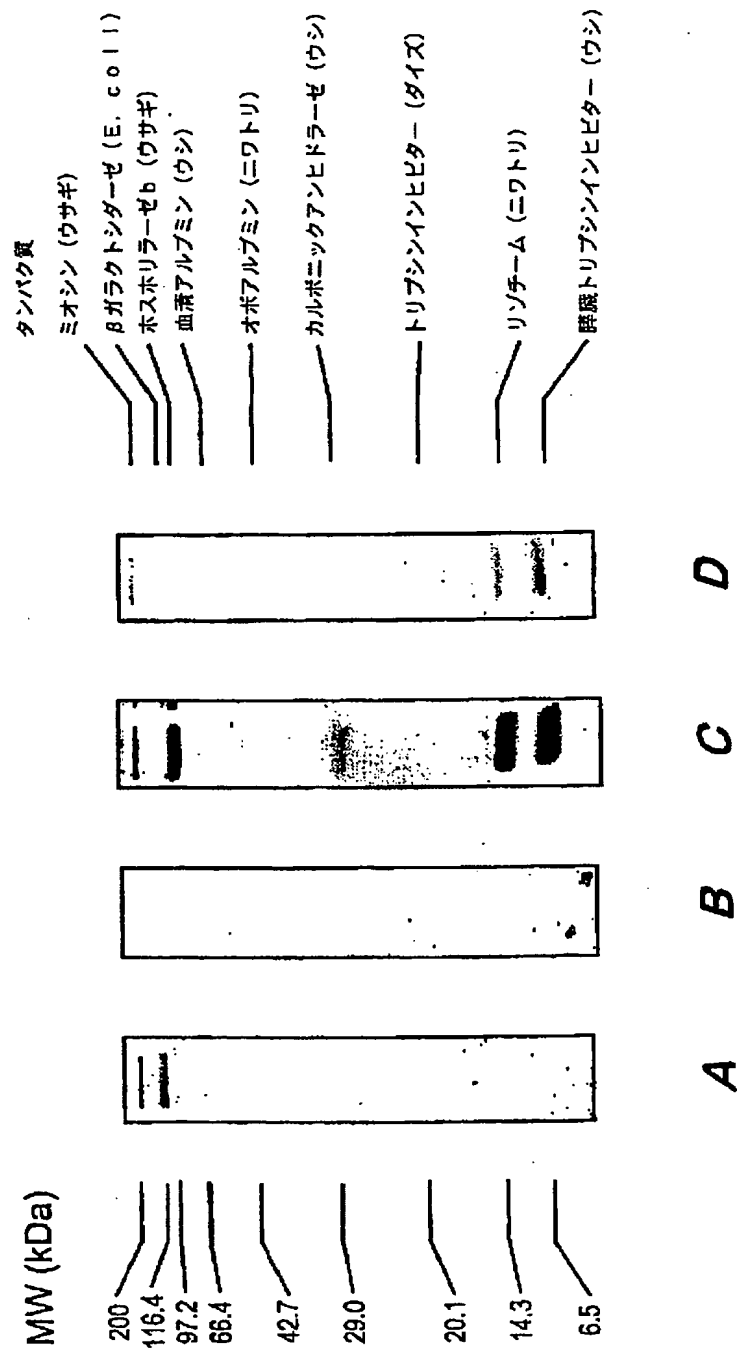


【図4】

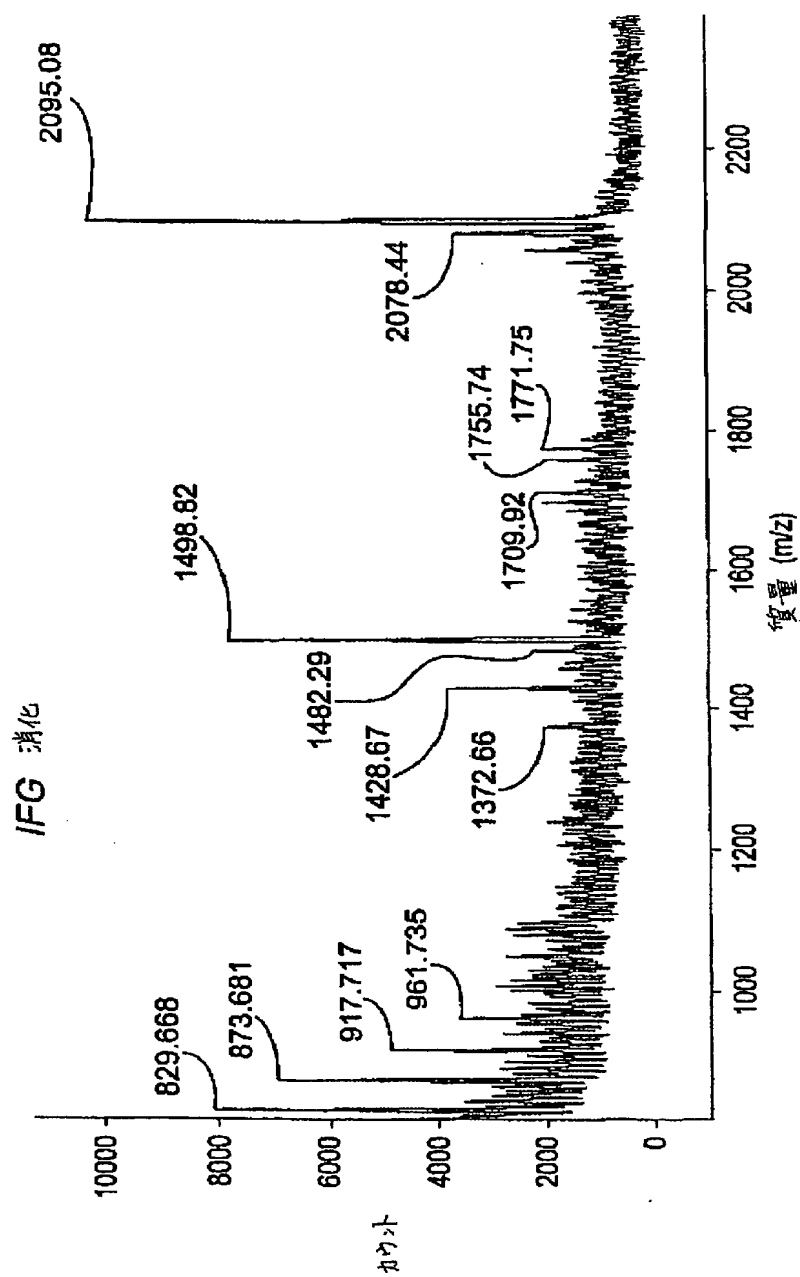




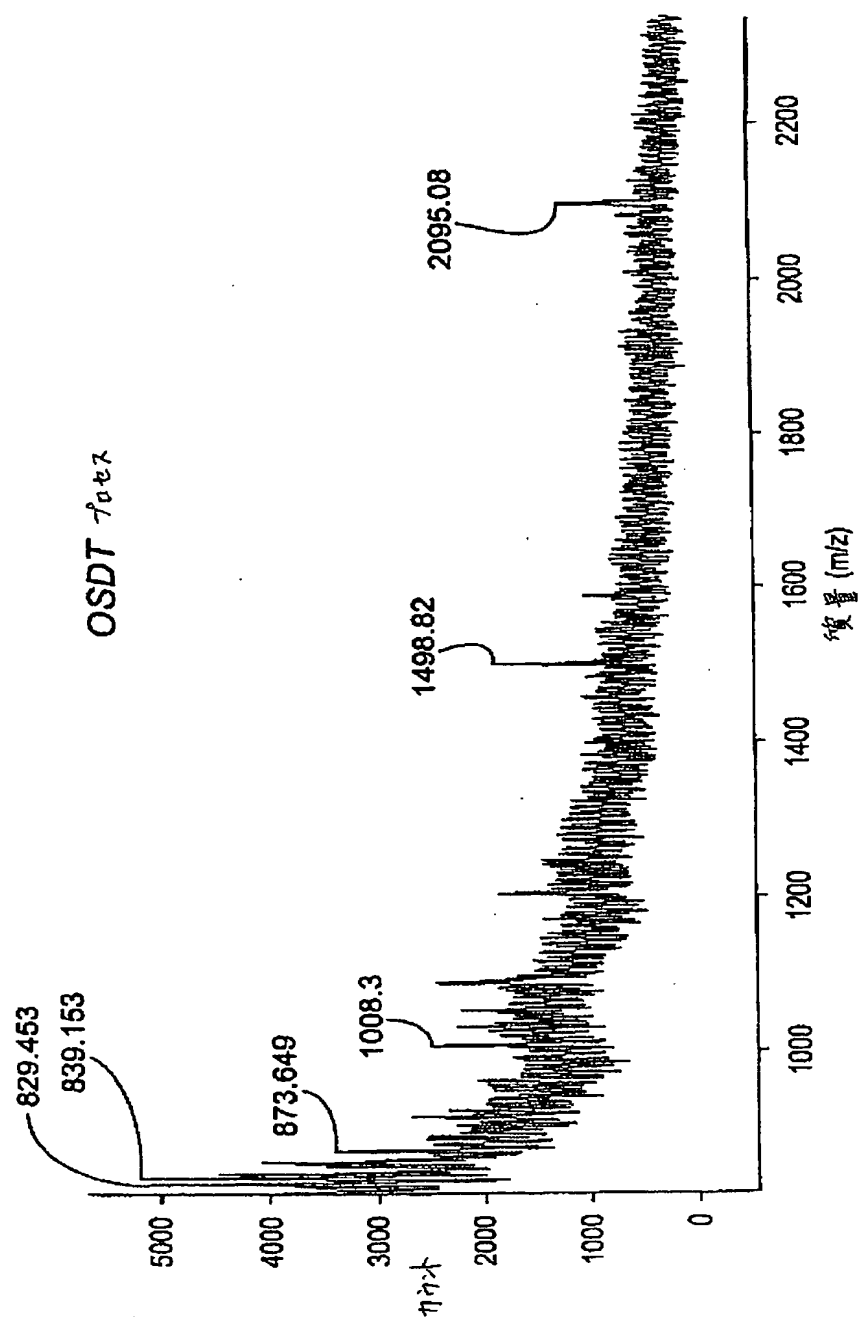
【図5】



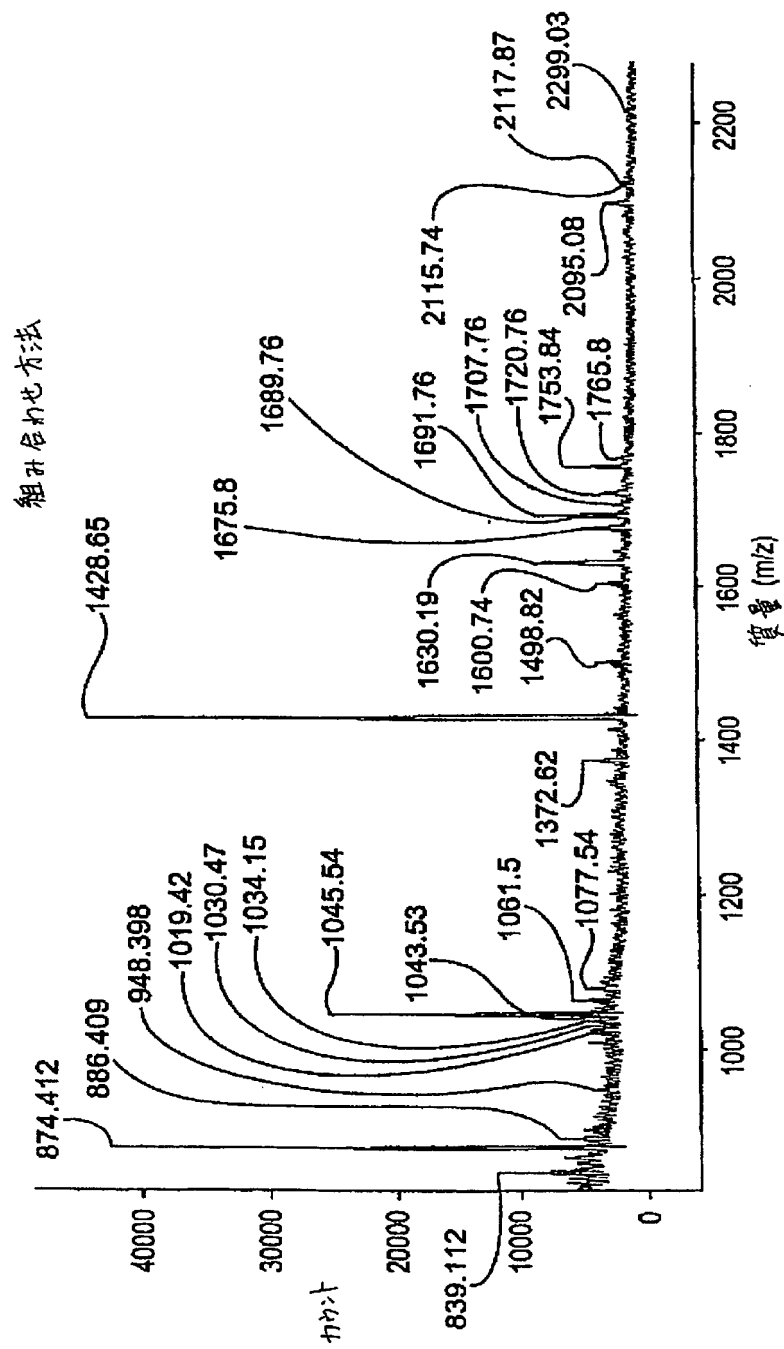
【図6A】



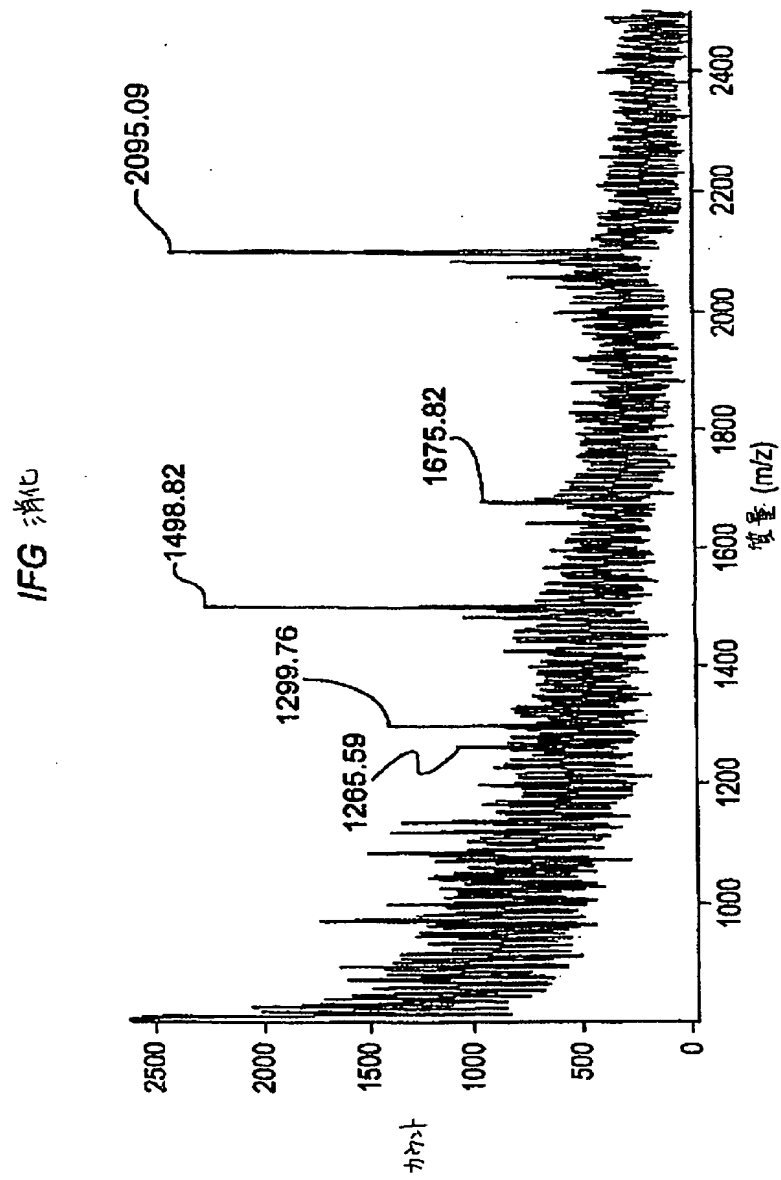
【図6B】



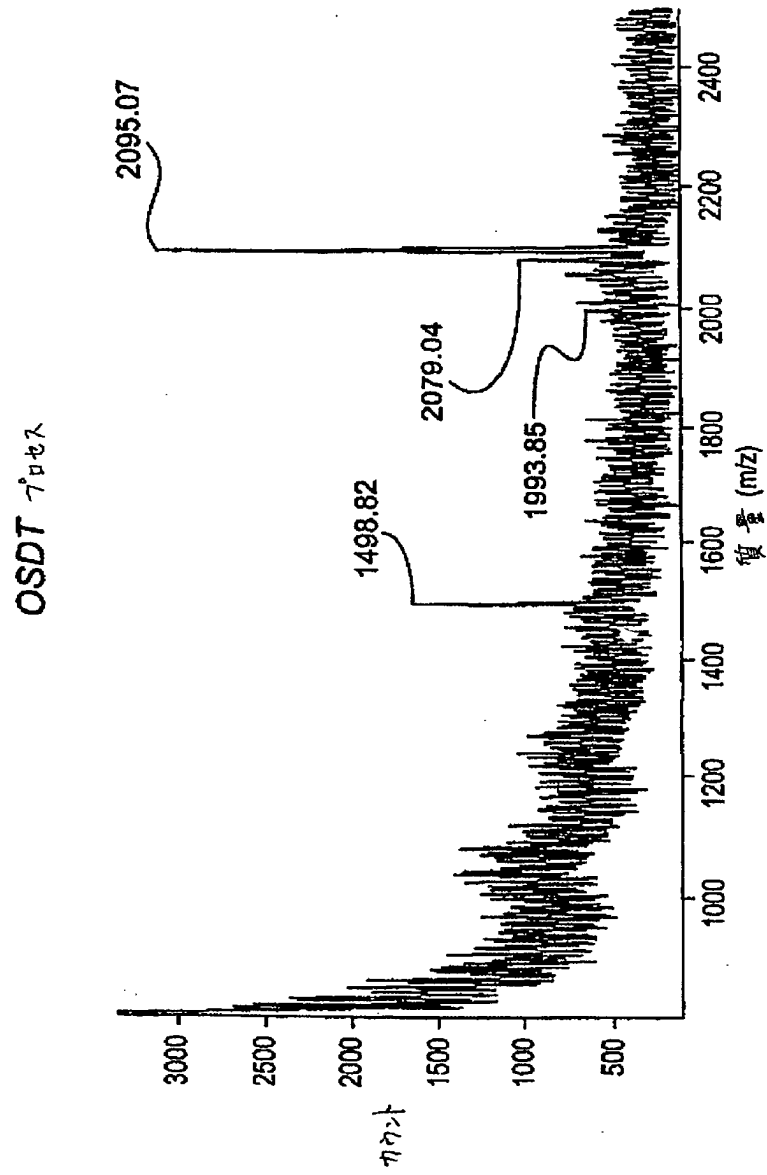
【図6C】



【図7A】

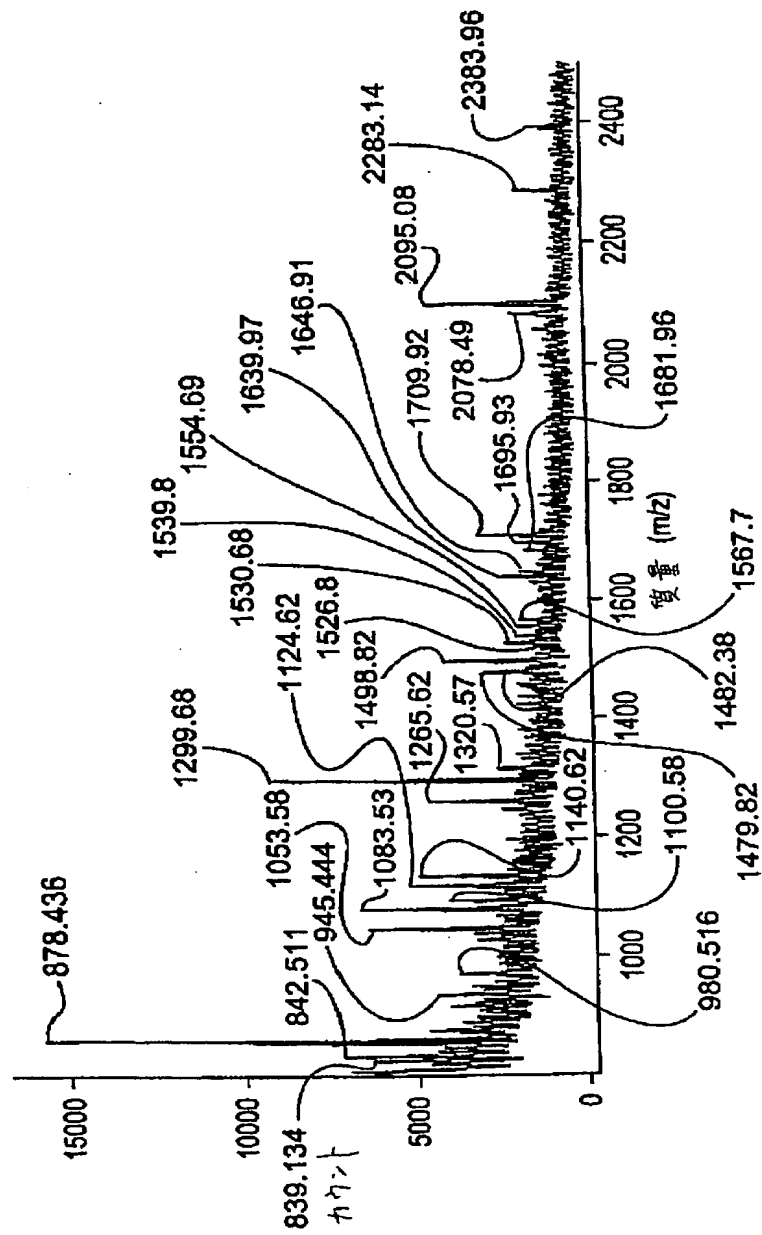


【図7B】



【図7C】

組み合わせ方法



【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/52 G01N33/68		Int. Application No. PCT/EP 00/00689
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 44 08 034 C (BRUKER FRANZEN ANALYTIK GMBH) 13 July 1995 (1995-07-13) abstract column 7, line 68 -column 8, line 5 claims 5-12	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 May 2000		Date of mailing of the international search report 24/05/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoekstra, S



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Application No  
PCT/EP 00/00689

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4408034	C	13-07-1995	GB 2287315 A, B	13-09-1995
			US 5595636 A	21-01-1997

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I  
T, LU, MC, NL, PT, SE), AU, JP, U  
S

(72)発明者 サンチェ, ジャンーシャルル  
スイス国 セーアッシュー1208 ジュネー  
ブ, シュマン フランクートマス 42

Fターム(参考) 2G045 BB51 DA36 FB01 FB05  
4B033 NA01 NA30 NB25 NB35 NB36  
NB63 ND04 ND05  
4B063 QA11 QA18 QQ79 QR16 QR82  
QS16 QS28 QS39 QX02 QX10